＊ 2011 年 12 月改訂 (第 2 版)
2011 年 10 月作成 (第 1 版)

この使用説明書をよく読んでから使用してください

研究用試薬

NASBA Amplification キット

【はじめに】

NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification) 法は、主としてRNAの鋳型に対して一本鎖のRNA断片をin vitroで特異的に直接増幅する方法です。NASBA法はポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) と同様に酵素を用いて核酸を増幅する方法ですが、PCRと異なりその増幅反応に温度サイクルを必要としません。さらに、RT-PCR法にてRNAを増幅する場合、操作が煩雑で時間も要していましたが、NASBA法を用いれば1回の反応で済み、時間も2時間以内で終了します。

＊【全般的な注意】

1) 本製品は研究用試薬です。診療上の診断に用いることはできません。
2) 使用説明書に記載以外の使用方法については保証を致しません。
3) 使用する機器の添付文書及び取扱説明書をよく読んでから使用してください。詳細は機器メーカーにお問い合わせください。
4) 本製品は核酸 (RNA) を対象とし、大量のRNAを生成するものです。検体や増幅産物の取扱いを誤ると検査結果に大きく影響しますので、遺伝子操作に関する注意点をよく理解して実施してください。

【形状・構造等（キットの構成）】

1. NASBA 試薬： dNTPs、NTPs
2. NASBA 溶解液： トリス緩衝液
3. NASBA 酵素試薬： AMV-RT、RNase H、T7 RNA polymerase
4. NASBA コントロールプライマー：
   ヒトβ-actin プライマー (forward and reverse)

【測定原理】

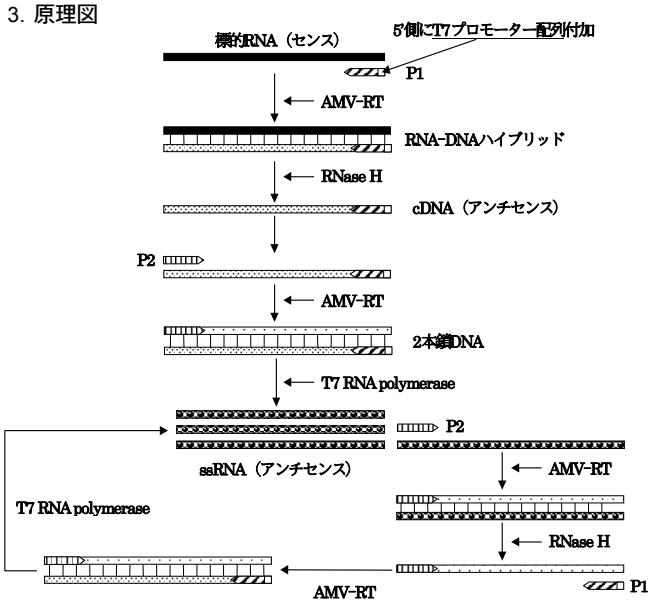
1. 原理

NASBAは標的RNAに特異的な2種類のプライマー及び3種類の酵素 (AMV-RT、RNaseH、T7 RNA polymerase) を用いた遺伝子増幅法です。

標的RNA (センス) に相補的なP1プライマー (P1) は5'側にT7 RNA polymeraseのプロモーター配列が付加されています。P2プライマー (P2) は、P1が伸長して生じるアンチセンスcDNA鎖に相補的な配列を有しています。P1を標的RNAにアニールさせると、AMV reverse transcriptase (AMV-RT) によりP1からの伸長反応 (アンチセンスcDNAの合成) が始まります。この伸長反応で形成されたRNA-DNAハイブリッドの標的RNAはRNaseHにより分解され、ハイブリッドはcDNA (アンチセンス) 1本鎖となります。この1本鎖になったcDNAにP2がアニールし、P2はAMV-RTのDNA polymerase活性により伸長し、T7 RNA polymeraseのプロモーターを含む2本鎖DNAが形成されます。このプロモーター配列をT7 RNA polymeraseが認識して、P2の5'-末端までを含む標的RNAに対しアンチセンス配列のRNAコピーを多数合成します。この時1本鎖のRNAは、RNaseHの基質にならないので分解されません。新しく合成されたアンチセンスRNAを鋳型として、P2からのセンスcDNAの合成及びRNase Hによる RNA-DNAハイブリッドの分解が行われます。1本鎖になったcDNA (センス) の3'-末端にP1がアニールし、AMV-RTにより2本鎖DNAが伸長され、再びT7プロモーター配列からアンチセンス配列のRNAコピーが多数合成されます。この一連のステップが一定温度で連続的に起こることにより、指数的にRNAが合成されます。この結果生じる主な増幅産物は、アンチセンスRNAです。

2. 特徴
   1) RNAを標的とし、アンチセンスRNAを増幅します。
   2) 2本鎖DNAは鋳型にならないので、RNAの特異的増幅が可能です。
   3) 増幅反応を一定温度で行うため、特別な装置は不要です。

3. 原理図



＊【操作上の注意】

1. 測定試料の性質、採取方法
   1) あらかじめ検体からRNAを抽出してください。
   2) 検体からのRNA抽出には、各施設で使用されているRNA抽出法に従ってください。RNA抽出試薬 (EXTRAGEN Ⅱ等) を使用する際は、各キットの使用説明書に従ってください。
   3) RNA濃度が高すぎるとNASBA反応を阻害することがありますので、total RNA 0.1 μg前後の検体量を使用してください。

2. その他
   1) RNase等による分解防止のため、検体からのRNA抽出操作を含め操作全般にわたって必ずマスク及びグローブを着用してください。
   2) 増幅操作は、なるべくクリーンベンチで行ってください。
   3) NASBAコントロールプライマーは、ヒトβ-actinに特異的なプライマーセットです。NASBA Amplification キットの試薬調製及び操作の精度管理用として、ヒト検体 (total RNA) に対して使用してください。

＊【用法・用量（操作法）】

1. 準備
   1) プライマー：
      標的とするRNAに相補的な配列を含むプライマー1 (P1) 及びプライマー2 (P2) の2種類を準備してください。P1の5'側にT7プロモーター配列が含まれていることが必要です。
      T7プロモーター配列：5'-AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAG
   2) 精製水 (RNase free water)：
      分子生物学グレードのものを準備ください。

＊ 2011 年 12 月改訂 (第 2 版)
2011 年 10 月作成 (第 1 版)

2. 試薬の調製方法
1) NASBA反応溶液:
NASBA試薬をスピンダウンした後、NASBA試薬1チューブにNASBA溶解液55 μLを加え、直ちにvortexを行い十分に溶解してください。
調製後は使用するまで氷上に置かず、常温に置いてください。
保存する場合、4℃で1週間、−20℃以下で1ヵ月間使用できます。
凍結融解は2回まで反応に影響しません。

2) コントロールプライマー
そのまま使用してください。

3) 反応液
NASBA反応溶液10 μLにプライマー溶液 (標的RNAに相補的なプライマー:P1、P2) を最終濃度0.4 μmol/Lになるようにそれぞれ加え、穏やかにvortexして混和してください。
溶解後は遠心しないでください (液を手で振り落とす程度)。
調製後は使用するまで氷上に置かず、常温に置いてください。
※ 同一のプライマーを用いる場合、NASBA反応溶液1チューブ (60 μL) にプライマー溶液を最終濃度0.4 μmol/Lになるように添加してください。

4) NASBA酵素液:
NASBA酵素試薬をスピンダウンした後、精製水 (RNase free water) 30 μLを加え、10秒程度待ってからタッピングなどにより溶解・混和してください。vortex等による激しい溶解・混和は酵素が失活するため、行わないでください。

3. 必要な器具・器材・試料等
1) マイクロピペット (10 μL、200 μL)、フィルターチップ
2) ヒートブロック (41℃、65℃)
3) ボルテックスミキサー
4) 小型卓上遠心機

4. 操作法 (NASBA増幅法)
1) 0.5 mLチューブに反応液を10 μLずつ分注する (分注後のチューブは常温に置く)。
抽出RNAを5 μLずつ各チューブに分注し、10回ピペッティングして混合する。
※ チューブ内の液が散った場合は遠心してください。
2) 各チューブを65℃のヒートブロックで5分間保温する。
※ 増幅効率の高い項目では65℃の反応は省略可能です。
3) 41℃のヒートブロックで5分間保温する。
各チューブをヒートブロックに入れた状態のまま、NASBA酵素試薬を5 μLずつ反応液に直接添加し、4、5回ピペッティングして混合する。
4) そのまま41℃のヒートブロックで90分間保温する。
※ NASBA酵素試薬添加後の最初の5分間は、NASBA初期反応に重要ですので、遠心など温度低下を招く操作は控えてください。
5) 反応終了後、検出操作に移行する。
※ NASBA増幅産物は、-20℃以下で保存してください。

＊【使用上又は取扱い上の注意】

1. 取扱い上 (危険防止) の注意
1) 検体は感染の危険性があるものとして取扱いには十分注意してください。また、検体に接触した器具等は検体と同様、感染の危険性のあるものとして取扱ってください。
2) 試薬が誤って眼や口に入った場合は、水で十分に洗い流す等の応急処置を行い、必要があれば医師の手当を受けてください。

2. 使用上の注意
1) 各試薬は保存温度を厳守してください。試薬保存にあたっては、コンタミネーション防止に注意してください。
2) 増幅反応に使用する試液は2種類ありますので、調製時及び操作時に取り違えないように注意してください。
3) NASBA増幅産物は-20℃で数週間保存可能ですが、長期間保存を行う際はディープフリーザー (-70℃以下) で保存してください。
4) ラベルに記載されている使用期限内に使用してください。
5) ロットの異なる試薬を混合して使用しないでください。

3. 廃棄上の注意
1) 使用後の容器を廃棄する場合は、貴施設の廃棄物に関する規定に従って医療廃棄物又は産業廃棄物等を区別して処理してください。
2) 本製品を廃棄する場合は、水質汚染防止法等の関連法規に従って処理してください。

【貯蔵方法・有効期間】

貯蔵方法 : -20℃以下 遮光保存
有効期間 : 12ヵ月 (使用期限は容器ラベル及び外箱に表示)

【包装単位】

製品名		管理コード	包装
NASBA Amplification キット	NASBA試薬	BI-0250	55 μL用× 10
	NASBA溶解液		60 μL× 10
	NASBA酵素試薬		30 μL用× 10
	NASBAコントロールプライマー		6 μL× 1

【主要文献】

1) J. Compton : Nature, 350:91-92 (1991)
2) 川口竜二、他 : 臨床検査, 41, 13:1798-1801 (1997)
3) 宝田裕、他 : 遺伝子医学, 2:105-110 (1998)

【問い合わせ先】

株式会社カイノス 学術部
〒113-0033 東京都文京区本郷2-38-18
☎ 03 (3816) 4480 FAX 03 (3816) 6544

輸入先
Life Sciences Advanced Technologies, Inc.

製造販売元
株式会社カイノス
〒113-0033 東京都文京区本郷2-38-18 ☎ 03 (3816) 4485